

Julie Christine Martins

**COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS TRANSCRIPTÔMICAS DE  
*Schizothorax richardsonii*, *Neogobius melanostomus* e *Proterorhinus  
semilunaris* À EXPOSIÇÃO A EXPERIMENTOS QUE SIMULAM  
OS AUMENTOS DE TEMPERATURA DA ÁGUA**

Florianópolis  
2018

Julie Christine Martins

**COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS TRANSCRIPTÔMICAS DE  
*Schizothorax richardsonii*, *Neogobius melanostomus* e *Proterorhinus  
semilunaris* À EXPOSIÇÃO A EXPERIMENTOS QUE SIMULAM  
OS AUMENTOS DE TEMPERATURA DA ÁGUA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito para o  
cumprimento da disciplina TCC II  
(BIO7016) do currículo do Curso  
de Graduação em Ciências  
Biológicas da Universidade Federal  
de Santa Catarina. Orientador:  
Prof. Dr. Guilherme de Toledo e  
Silva

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martins, Julie Christine  
COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS TRANSCRIPTÔMICAS DE  
*Schizothorax richardsonii*, *Neogobius melanostomus* e  
*Proterorhinus semilunaris* À EXPOSIÇÃO A EXPERIMENTOS  
QUE SIMULAM OS AUMENTOS DE TEMPERATURA DA ÁGUA /  
Julie Christine Martins ; orientador, Guilherme de  
Toledo e Silva, 2018.  
51 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Mudanças climáticas. 3.  
Aquecimento global. 4. RNA-seq. I. Toledo e Silva,  
Guilherme de. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III.  
Título.

Julie Christine Martins


**COMPARAÇÃO DAS RESPOSTAS TRANSCRIPTÔMICAS DAS  
ESPÉCIES *Schizothorax richardsonii*, *Neogobius melanostomus* e  
*Proterorhinus semilunaris* À EXPOSIÇÃO A EXPERIMENTOS  
QUE SIMULAM OS AUMENTOS DE TEMPERATURA DA  
ÁGUA**


Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para  
obtenção do Título de Bacharela em Ciências Biológicas e aprovada em  
sua forma final.

Florianópolis, 19 de Novembro de 2018.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Guilherme de Toledo e Silva  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Patrícia Hermes Stoco  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Guilherme Razzera Maciel  
Universidade Federal de Santa Catarina

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Santa Catarina, por sua estrutura e por proporcionar uma formação de excelente qualidade no Curso de Ciências Biológicas.

Ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica e à Superintendência de Governança Eletrônica e Tecnologia da Informação e Comunicação da UFSC por fornecerem os computadores nos quais realizei as análises deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Guilherme de Toledo e Silva por tornar possível a realização deste trabalho através de sua orientação e por sua paciência e dedicação para ensinar-me sobre a área de bioinformática desde o início.

Aos meus pais por fornecerem-me o privilégio de uma educação de qualidade desde a infância e por todo o suporte que me proporcionaram.

À minha namorada, companheira e amiga, Bethina, por ser minha calma nos momentos difíceis, por estar sempre ao meu lado e por nossas discussões sobre educação, que foram cruciais para a minha construção como profissional.

À Karin, por nossa linda amizade, por nossos estudos e trabalhos intermináveis ao longo da madrugada.

À Laura por seus conselhos e conversas sobre a vida e por seus bolos, cafés e chás deliciosos.

## RESUMO

Segundo o último relatório de mudanças climáticas, realizado pelo *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC) (2014), o aquecimento médio global de 1880-2010 foi de 1,3°C, sendo as atividades humanas a provável maior causa desses aumentos. A temperatura ambiental tem grande influência na distribuição, fisiologia e comportamento dos organismos, principalmente das espécies ectotérmicas como a maioria dos peixes, visto que esses mantêm sua temperatura próxima ou igual a da água e trocam calor com o ambiente através de condução e convecção. Com o aumento das informações sobre transcriptomas, o presente trabalho buscou identificar padrões de resposta transcricional associados ao aumento de temperatura através da análise conjunta de transcriptomas de três espécies de peixes, *Schizothorax richardsonii*, *Neogobius melanostomus* e *Proterorhinus semilunaris*, a fim de auxiliar no desenvolvimento do conhecimento voltado a medidas de conservação, ecologia molecular e ecotoxicologia. Para tanto, foi realizada a montagem *de novo*, anotação funcional e análise de expressão diferencial dos transcritos de cada organismo. Com isso, pode-se verificar a influência da elevação da temperatura ambiental em espécies de peixes, principalmente para *P. semilunaris* e *S. richardsonii*, que se mostraram mais sensíveis, por apresentarem menor plasticidade fenotípica. A estruturação do citoesqueleto e da membrana celular, representada nessas espécies pela proteína *Annexin A6*, mostraram-se como componentes de extrema importância em situações de estresse térmico, tanto no presente estudo como na literatura sobre o assunto. As vias metabólicas e proteínas relacionadas a essas funções podem ser interessantes novos biomarcadores de estresse térmico. Porém, é necessário realizar estudos com mais espécies de peixes e que incluam análises de ortologia e de meta-análise, a fim de evitar vieses de anotação gerados pelos bancos de dados e por efeitos de lote de experimentos diferentes.

**Palavras-chave:** Mudanças climáticas. Aquecimento global. *RNA-seq*.

## ABSTRACT

According to the last report produced by the Intergovernmental Panel on Climate Change, the average global warming in the period of 1880-2010 raised 1,3°C, with the human activities probably being the main cause for this increase. The environment temperature has a great influence on the distribution, physiology and on the behavior of the organisms, mainly for ectothermic species, as most of the fishes, mostly because those keep their temperature near or the same as the water and change heat with the environment by conduction and convection. The present study aims to find transcriptional response patterns related to temperature raise through joint analysis of three species of fish, *Schizothorax richardsonii*, *Neogobius melanostomus* and *Proterorhinus semilunaris*, to assist in the development of knowledge on conservation measures, molecular ecology and ecotoxicology. The assembly, functional annotation and differential expression analysis of the three transcriptomes were made. Thereby, the influence of ambient temperature rise could be shown. Mainly, *P. semilunaris* and *S. richardsonii* seems to be more sensible to temperature changes, due to less phenotypic plasticity. The cytoplasmatic and cellular membrane structures, represented in these species by Annexin A6 protein, are components of extreme importance in thermal stress situations, in the present study and in the literature about this subject. The metabolic pathways and proteins related to these functions can be interesting new thermal stress biomarkers. However, it's necessary to do more studies using more fish species and with appropriate orthology analysis and transcriptome meta-analysis, in order to avoid annotation biases generated by databases and by batch effect from different experiments.

**Keywords:** Climate change. Global warming. RNA-seq.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação taxonômica e imagem de <i>S. richardsonii</i> .....	13
Figura 2 – Classificação taxonômica e imagem de <i>N. melanostomus</i> ....	14
Figura 3 – Classificação taxonômica e imagem de <i>P. semilunaris</i> .....	15
Figura 4 – Diagrama de Venn dos transcritos <i>downregulated</i> em comum entre as espécies em estudo, a repetições de anotação na mesma espécie não foram consideradas.....	26
Figura 5 – Diagrama de Venn dos transcritos <i>upregulated</i> em comum entre as espécies em estudo, a repetições de anotação na mesma espécie não foram consideradas.....	27



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações obtidas de BARAT et al. (2016) e WELLBAND; HEATH (2017) acerca sobre as espécies pesquisadas, experimentos realizados e sequenciamento de RNA.....	19
Tabela 2 – Porcentagem de leituras com alta qualidade.....	22
Tabela 3 – Métricas de qualidade das montagens dos transcriptomas das espécies <i>S. richardsonii</i> , <i>N. melanostomus</i> e <i>P. semilunaris</i> produzidas neste trabalho.....	22
Tabela 4 – Dados quantitativos de análise de expressão diferencial e anotação funcional dos transcriptomas das três espécies em estudo. Expressão diferencial estatisticamente significativa de isoformas e genes (p-valor de $1e-3$ e expressos no mínimo com <i>fold change</i> 4). Anotação realizada no banco de dados Swiss-Prot (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2016).....	23
Tabela 5– Transcritos <i>upregulated</i> da espécie <i>S. richardsonii</i> anotados como HSPs.....	20
Tabela 6 – Anotação dos transcritos <i>downregulated</i> em comum entre as espécies estudadas.....	28
Tabela 7 – Anotação dos transcritos <i>upregulated</i> em comum entre as espécies estudadas.....	29

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1 MUDANÇAS CLIMÁTICAS.....	11
1.2 EFEITOS DO AUMENTO DE TEMPERATURA EM PEIXES ....	12
1.3 RESPOSTAS MOLECULARES ÀS MUDANÇAS DE TEMPERATURA EM PEIXES.....	13
1.4 USO DA TRANSCRIPTÔMICA NA CONSERVAÇÃO.....	17
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>20</b>
4.1 OBTENÇÃO DOS DADOS.....	20
4.2 MONTAGEM DOS TRANSCRIPTOMAS .....	21
4.3 MAPEAMENTO E QUANTIFICAÇÃO .....	22
4.4 ANÁLISES DOS RESULTADOS .....	23
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
5.1 MONTAGEM DOS TRANSCRIPTOMAS .....	23
5.2 EXPRESSÃO DIFERENCIAL E ANOTAÇÃO.....	24
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>37</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>
<b>APÊNDICE A – TABELA 1 .....</b>	<b>50</b>
<b>APÊNDICE B – TABELA 2.....</b>	<b>51</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MUDANÇAS CLIMÁTICAS

Segundo o último resumo de mudanças climáticas, realizado pelo *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC) (2014), houve um acréscimo de temperatura de 0,85 °C no período de 1880 a 2012. O aquecimento médio global de 1880 a 1951 foi de 0,5°C, já de 1951-2010 foi de 0,5 °C para 1,3 °C, sendo as atividades humanas, a provável maior causa desses aumentos, através da industrialização e da agropecuária. Isso, pois mais de 50% desses efeitos devem-se aos aumentos da concentração de gases de efeito estufa na atmosfera, na qual a concentração média global de dióxido de carbono aumentou em 40%, de metano em 150% e de óxido nitroso, em 20%. Ainda, as previsões de acréscimo de temperatura para os períodos de 2081-2100 são de 2,6°C, caso ocorra uma baixa na emissão de gases ou de 4,8°C, com a atual alta emissão desses (GUNSTER, 2016; GONZÁLEZ; FROSTELL; CARLSSON-KANYAMA, 2011; MCMICHAEL et al., 2007; IPCC, 2014).

Os efeitos das mudanças climáticas diferem entre as regiões geográficas (IPCC, 2007). Estima-se que em regiões de alta latitude e na Europa Ocidental haverá aumento da temperatura. Esses aquecimentos influenciarão o derretimento das geleiras e, com maior ou menor intensidade, aumentarão os níveis dos mares (HASSOL, 2004). Além disso, as temperaturas oceânicas irão variar de maneira menos intensa, sendo as áreas rasas as mais afetadas (HULME et al., 2002). Ainda, haverá mudanças na sazonalidade e intensidade da precipitação e do escoamento dos rios, aumentando a diferença de escoamento entre o verão e o inverno (FREI et al., 2006).

As mudanças climáticas têm influenciado na biodiversidade, no aumento do risco de extinção e na distribuição geográfica de muitas espécies (DEUTSCH et al., 2008; THOMAS et al., 2004). Sob exposição ao estresse térmico, a influência sobre a homeostasia e a sobrevivência pode variar dependendo da fisiologia das espécies, o que pode comprometer componentes importantes na vida dos organismos (HOFFMANN, 1995). O principal mecanismo de resposta a mudanças climáticas das populações animais inclui mudanças evolucionárias a nível populacional e plasticidade fenotípica individual, que permite adaptação rápida quando comparada a adaptação evolutiva (BRADSHAW; HOLZAPFEL, 2008). Ainda, diferentes genótipos podem responder a condições ambientais de diferentes formas através da

plasticidade fenotípica, contudo essa é custosa, o que leva a baixo *fitness* nos genótipos com alta plasticidade devido ao alto custo de manutenção fisiológica gerado (DEWITT; SIH; WILSON, 1998).

## 1.2 EFEITOS DO AUMENTO DE TEMPERATURA EM PEIXES

A temperatura ambiental tem grande influência na distribuição, na fisiologia e no comportamento dos organismos, principalmente nos ectotérmicos como é o caso da maioria dos peixes. Esses mantêm sua temperatura próxima ou igual a da água e trocam calor com o ambiente através de condução e convecção (NARUM et al., 2013). As mudanças climáticas afetam os fatores abióticos e por consequência os ecossistemas aquáticos e suas espécies. Isso ocorre em diferentes intensidades, dependendo dos ambientes e das adaptações das espécies, sendo assim, esses fatores estão intimamente ligados à produção e distribuição das populações de peixes (YANG, 1982; WALTHER et al., 2002).

Peixes têm um ciclo de vida complexo, com vários estágios. A sensibilidade dos estágios larvais a mudanças climáticas pode ser maior por apresentarem migração, por possuírem menor tamanho corporal, com pouca reserva energética e um metabolismo acelerado em função de seu desenvolvimento. Nas fases iniciais, esses animais tendem a suportar menores amplitudes de temperatura, que dependem de regiões geográficas e condições abióticas variadas. Portanto, durante suas vidas, podem ser afetados de diferentes maneiras em um cenário de mudanças climáticas. Assim, podem causar respostas fisiológicas, comportamentais, de dinâmica populacional e mudanças ecossistêmicas em relação à produtividade e interações tróficas (RIJNSDORP et al., 2009).

A tolerância a temperaturas altas e baixas em peixes marinhos muda em relação à latitude, sendo que peixes habitando latitudes baixas e altas toleram uma amplitude menor. Populações habitando seus limites de distribuição serão mais vulneráveis quando comparadas com aquelas no centro de distribuição, pois são tipicamente pequenas e isoladas geograficamente e com pouca diversidade genética (RIJNSDORP et al., 2009). Além disso, como a temperatura da água tem correlação com sua profundidade, os peixes de águas mais rasas tenderão a habitar áreas mais profundas (DULVY et al., 2008).

### 1.3 RESPOSTAS MOLECULARES ÀS MUDANÇAS DE TEMPERATURA EM PEIXES

As mudanças climáticas podem afetar os peixes de maneira letal ou subletal, sendo a primeira relativamente simples de ser documentada e aplicada no manejo das espécies. As respostas subletais podem levar a alterações na reprodução e aumento da susceptibilidade a doenças, levando a diminuição das populações ao longo das gerações (CONNON et al., 2018). A aclimação de ectotérmicos resulta em transcrição de genes associados a processamento de proteínas, transcrição e tradução. Além desses processos básicos, são encontradas alterações transcricionais de genes envolvidos em resposta a estresse oxidativo, apoptose, metabolismo energético, fluidez de membranas celulares, imunidade (catalase, superoxidase dismutase, glutathione-S-transferase) e enzimas do metabolismo de carboidratos (glicogênio fosforilase e fosfofrutoquinase) (PODRABSKY; SOMERO, 2004; BARAT et al., 2016). Com isso, identificar genes e vias diferencialmente expressos sob condições térmicas extremas pode auxiliar a compreender a aclimação molecular (AKBARZADEH; LEDER, 2015).

Com exceção de algumas espécies adaptadas a climas extremos (LOGAN; BUCKLEY, 2015; BILYK; CHENG, 2014), a maioria dos estudos de peixes em exposição a estresse térmico de curto período mostra que as proteínas de choque térmico, moléculas chaperonas que auxiliam na degradação, transporte, agregação, e dobramento de proteínas, são mais expressas. Por esses processos, essas proteínas protegem as células dos efeitos das mutações (MALONEY; WORKMAN, 2002).

Durante exposições por longos períodos a altas temperaturas, as chaperonas são pouco ou não induzidas, exibindo uma resposta diferente em relação à homeostase celular (FEDER; HOFMANN, 1999). A variação da temperatura ambiental influencia na demanda energética, sendo mais alta com o aumento da temperatura, tanto em populações adaptadas a ambientes com divergência de temperatura, como em indivíduos isolados expostos a estresse térmico (GILLOOLY et al., 2001). Além disso, as proteínas são degradadas mais rapidamente e os efeitos das mudanças de temperatura na taxa metabólica podem induzir mudanças fenotípicas, desde moleculares até à escala de organismo (CLARKE, 1993; SHAMA et al., 2016).

Na espécie modelo de pesquisa genética, *Danio rerio*, a exposição a calor tem sido associada a grandes mudanças de regulação transcricional (LONG et al., 2013). Por exemplo, os fatores de regulação e as vias de sinalização de metabolismo e funcionamento mitocondrial podem ser importantes para a aclimação térmica e sensibilidade (WINDISCH et al., 2001). A regulação de genes envolvidos no metabolismo também pode ser afetada, pois a célula necessita de energia para mecanismos de resposta e reparo, aumentando vias como glicólise, glicogênese, ciclo de ácido tricarboxílico e cadeia de transporte de elétrons (PODRABSKY; SOMERO, 2004).

Em experimentos com exposição a condições extremas por curtos períodos de tempo (entre 1-120h), podem-se analisar as respostas gênicas imediatas dos organismos. Essas são respostas de curto tempo e muitas não persistem, voltando aos níveis normais sem afetar o *fitness* do organismo (OOMEN; HUTCHINGS, 2017). Esses genes têm menos probabilidade de serem afetados seletivamente durante os processos de mudanças climáticas (KASSAHN et al., 2007). Contudo, esses estudos podem ser informativos em relação ao desenvolvimento das respostas a sinais ambientais (RAHMSTORF; COUMOU, 2011).

Em estudo, no qual a espécie *Gillichthys mirabilis* foi exposta a temperaturas elevadas por três semanas, foi constatado que, mesmo após a aclimação e queda na resposta ao estresse, a manutenção da homeostase pode ser custosa, com o custo energético dos processos de biossíntese de proteínas e transporte de íons, o que implica em uma menor disposição de energia para o forrageio, crescimento e reprodução (OOMEN; HUTCHINGS, 2017).

Barat et al. (2016) realizaram o estudo do transcriptoma de *Schizothorax richardsonii* (Figura 1), sob estresse térmico de 26 °C por 3, 12 e 24h. Essa é uma espécie que habita as regiões do Himalaia e Sub-Himalaia, com temperatura ambiente de  $10 \pm 2$  °C. Observou-se, sob estresse, um aumento na expressão de genes envolvidos na resposta a estímulos, vias metabólicas, alguns transcritos de proteínas do complemento 3 e proteína 4 associada ao citoesqueleto. Essa última deve-se a possível interferência da temperatura na estabilidade e integridade do citoesqueleto (KASSHAN et al., 2007). O transcrito codificante de uma proteína homóloga a B-trans-membrana C12orf23 foi outro com aumento de transcrição e está envolvida em comunicação célula-célula, transporte de íons e manutenção da estrutura celular para proteção a estímulos externos (HAERL; HAYER-HARTL, 2002).

O aumento da temperatura ambiental pode causar condições de hipóxia, ativando o metabolismo de lipídeos, o que resultou em um

aumento na transcrição de RNAm codificante da lipase triglicéride hepática, precursor de proteína 1 hipóxia-regulada, proteína de ligação a ácidos graxos 7, proteína de ligação a ácidos graxos e algumas proteínas da família de carreadores de soluto (BARAT et al., 2016).

Figura 1 – Classificação taxonômica e imagem de *S. richardsonii*.

Reino Animalia

Filo Chordata

Classe Actinopterygii

Ordem Cypriniformes

Família Cyprinidae

Gênero *Schizothorax*

Espécie *Schizothorax richardsonii*



Fonte: *University of Kansas Biodiversity Institute* (2013).

Wellband e Heath (2017) desenvolveram um trabalho com duas espécies invasoras dos Grandes Lagos Laurentinos, *Neogobius melanostomus* (Figura 2) e *Proterorhinus semilunaris* (Figura 3), ambos da família Gobiidae e originárias de Ponto-Caspian, uma região da Europa oriental. Essas vivem em ambientes com temperatura média de 18 °C e foram expostos a estresse térmico de 25 °C por 24 h. *N. melanostomus* não apresentou expressão acentuada para nenhum dos processos biológicos, apenas diminuição da expressão de genes relacionados a ciclo celular, replicação de DNA, divisão celular e repressão de proteólise mediada por ubiquitina, ou seja, mostra aumento dessa proteólise. Em contraste, *P. semilunaris* sob estresse exibiu aumento de expressão de processos envolvidos em resposta imune humoral e ativação de resposta imune. Além disso, genes relacionados à ativação de tRNA e metabolismo de rRNA e tRNA apresentaram-se regulados negativamente, sugerindo uma queda na atividade traducional.

Figura 2 – Classificação taxonômica e imagem de *N. melanostomus*.

Reino Animalia

Filo Chordata

Classe Actinopterygii

Ordem Perciformes

Família Gobiidae

Gênero *Neogobius*

Espécie *Neogobius melanostomus*



Fonte: Sapota (2012) e *Global Biodiversity Information Facility* (2018).



Figura 3 – Classificação taxonômica e imagem de *P. semilunaris*.

Reino Animalia  
 Filo Chordata  
 Classe Actinopterygii  
 Ordem Perciformes  
 Família Gobiidae  
 Gênero *Proterorhinus*  
 Espécie *Proterorhinus semilunaris*



Fonte: *The Fish Collection at the Zoologische Staatssammlung München* (2004)

Como visto através dos dados expostos, os fatores ambientais alterados com as mudanças climáticas interferem nos processos biológicos nos seus vários níveis de organização e as populações de peixes são afetadas por esses múltiplos fatores. Apesar de as mudanças climáticas alterarem diversos parâmetros moleculares e celulares, é possível procurar padrões entre as respostas das espécies e desenvolver hipóteses sobre o efeito dos fatores climáticos sobre as populações de peixes, levando em consideração os diferentes níveis de organização biológica (RIJNSDORP et. al., 2009).

#### 1.4 USO DA TRANSCRIPTÔMICA NA CONSERVAÇÃO

Os estudos moleculares de conservação de espécies tradicionalmente utilizaram os conhecimentos de genética para auxiliar a detectar subestrutura de populações naturais, medir conectividade genética e identificar potenciais riscos associados a mudanças demográficas e endogamia. Atualmente, devido aos avanços tecnológicos e à redução de custos, houve um aumento dos estudos

utilizando as mais diversas metodologias baseadas em ômicas, como genômica, transcriptômica e proteômica. Neste contexto, as áreas de conservação biológica têm integrado esses novos dados e análises em suas áreas de atuação (CONNON et al., 2018; SHAFER et al. 2015). A conservação biológica deve incluir múltiplas disciplinas em suas análises, a fim de proteger a biodiversidade e os serviços ecossistêmicos de forma mais eficiente (SOULÉ, 1985). O aumento do conhecimento de biologia básica das espécies, incluindo estudos sobre genomas e transcriptomas, perfis fisiológicos e parâmetros ecológicos podem contribuir com a preservação das espécies. Os transcriptomas podem ser usados para entender os mecanismos bioquímicos e moleculares por trás de uma característica fenotípica ou uma habilidade funcional dos organismos sob determinada condição. Também, têm a potencialidade de apontar respostas gênicas a gradientes de estresse e diferenciar gradientes de homeostasia, compensação e potencial de reversibilidade e recuperação de danos (CONNON et al., 2018).

Sequenciamentos de nova geração de RNA, por obterem dados referentes à totalidade de moléculas de RNA mensageiro presentes em determinado tecido ou célula, podem determinar características de expressão gênica em um ambiente e suas condições. Além disso, possuem resolução de par de base e a há maior relação de precisão-volume de dados quando comparado com outros métodos de sequenciamento, como as técnicas de microarranjo (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Outra vantagem do uso de transcriptomas é a aplicação de análises comparativas desses entre os táxons e sob diferentes condições, pois podem fornecer informações relevantes a fim de auxiliar na compreensão das diferenças moleculares que permeiam as mudanças adaptativas, fator importante ao abordar as alterações climáticas (BILYK; CHENG, 2013).

Um dos principais motivos para o raro uso de dados de transcriptoma nos estudos de conservação das espécies e em manejos é a barreira de linguagem entre a pesquisa e as políticas de conservação. O descrito, geralmente, ocorre porque aqueles que constroem as políticas não estão familiarizados com os dados moleculares, assim como os pesquisadores dessa área não estão familiarizados com as a regulação das políticas de conservação. Para transpassar essa barreira é necessária à comunicação entre essas áreas, que pode ser realizada através de parcerias entre as áreas do conhecimento (GARNER et al. 2016).

## 2 JUSTIFICATIVA

O IPCC (2014) mostra que, durante as últimas décadas, as mudanças climáticas estão acontecendo cada vez mais rápido, principalmente nas questões relacionadas ao aumento de temperatura. Os peixes, por viverem em ambientes aquáticos, serem ectotérmicos e possuírem ciclos de vida complexos são muito afetados pelo aquecimento.

Durante a revisão bibliográfica encontrou-se nove trabalhos de sequenciamento de nova geração de RNA de fígado envolvendo experimentos de exposição de peixes a aumentos de temperatura. O sequenciamento de RNA do fígado foi escolhido, pois é o órgão central de manutenção da homeostase e assim, pode ser afetado com o aumento de temperatura devido às mudanças metabólicas (CLARKE; FRASER, 2004).

Observou-se, principalmente, o aumento de transcritos de proteínas relacionadas a estresse e ao sistema imune (SMITH; BERNATCHEZ; BEHEREGARAY, 2013; HUTH; PLACE, 2013; VEILLEUX et al., 2015; JESUS et al., 2016; BARAT, et al., 2016; LI et al., 2017; WELBAND; HEATH, 2016; KIM et al., 2017; BRAUER; UNMACK; BEHEREGARAY, 2017). Contudo, os trabalhos apresentaram os efeitos do aumento de temperatura para cada espécie envolvendo perfis de transcrição gênica diferencial, porém não foi realizado até o presente momento um estudo que compare essas respostas, facilitando o entendimento da biologia de peixes frente ao estresse térmico. Por sua vez, os dados de bioinformática, como qualquer outro, principalmente os que se encontram em fase exploratória, precisam ser analisados com critérios bem estabelecidos, ser bem documentados e utilizados em conjunto com estudos de fisiologia e ecologia, antes de serem utilizados nas práticas de conservação. Com o aumento das informações de transcriptoma, o presente trabalho busca identificar padrões de resposta transcricional a fim de gerar dados a serem utilizados em estudos de conservação de peixes. Associada às métricas convencionais, a bioinformática pode se tornar mais eficiente em relação à conservação, área que, mais do que qualquer outra necessita de uma análise sistêmica devido a sua importância social e ambiental (SHAFFER et al. 2015; GARNER et al. 2016; CONNON et al., 2018).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar padrões de resposta transcricional frente ao aumento de temperatura entre as espécies *Schizothorax richardsonii*, *Neogobius melanostomus* e *Proterorhinus semilunaris*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Montar *de novo* transcriptoma das três espécies de peixes.
- II. Analisar os perfis transcriptômicos das três espécies sob efeitos de mudanças de temperatura.
- III. Identificar genes expressos em comum nesses peixes com o aumento da temperatura.

### 4 METODOLOGIA

#### 4.1 OBTENÇÃO DOS DADOS

A partir da revisão realizada, foram selecionados dois trabalhos para a realização do presente estudo, devido ao uso da plataforma Illumina para o sequenciamento, a exposição das espécies a somente uma condição de alteração ambiental, o aumento da temperatura, e pela disponibilidade dos dados ao público. Obtiveram-se os dados utilizados no trabalho por meio do *download* das leituras de ambos os estudos através do banco de dados *Sequence Read Archive* (SRA) (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018) através dos códigos de estudo: SRX643306 (BARAT et al., 2016), SRP075124 e SRP075141 (WELLBAND; HEATH, 2017). Na Tabela 1, estão dispostas as informações obtidas dos artigos base do presente trabalho sobre as espécies pesquisadas, os experimentos realizados e sobre o sequenciamento de RNA. Para a espécie *S. richardsonii* foi realizada apenas uma biblioteca de leituras controle e uma exposta, com os três tempos de exposição a 26°C (3, 12 e 24h). Já para *N. melanostomus* e *P. semilunaris* foram realizadas réplicas biológicas, com três bibliotecas para cada situação experimental, controle e expostas a 25°C temperatura por 24h.

Tabela 1 – Informações obtidas de BARAT et al. (2016) e WELLBAND; HEATH (2017) acerca sobre as espécies pesquisadas, experimentos realizados e sequenciamento de RNA.

Estudo	Espécies	Temperatura Ambiental	Condições Experimentais	Tempo de exposição	Órgão estudado	Plataforma de Sequenciamento
Barat et al., 2016	<i>S. richardsonii</i>	10 ± 2°C	26°C	3, 12 e 24h	Fígado	Illumina
Wellband e Heath, 2017	<i>N. melanostomus</i> e <i>P. semilunares</i>	18°C	25°C	24h	Fígado	Illumina

Fonte: Elaborada pela autora (2018).

#### 4.2 MONTAGEM DOS TRANSCRIPTOMAS

Primeiramente, as leituras foram tratados e trimados através do programa *Next Generation Sequencing Quality Control Toolkit* na versão 2.3.3 (NGSQCToolkit\_v2.3.3; PATEL; JAIN, 2012). Para tanto, foram filtrados aquelas com baixa qualidade (nota phred menor que 30 em 75% do tamanho daleitura) e comprimento inferior a 60 pb. Também, foram trimadas as bases da extremidade 3' com nota phred menor que 30.

Amáxima cobertura fragmentada do *read* foi definida como 30X e o tamanho do *k-mer* como 25 (HAAS et al., 2013). Nessa removeu-se leituras ou regiões desses com probabilidade de erro de sequenciamento (HAAS et al., 2013). Montaram-se os três transcriptomas por metodologia *de novo*, visto que não há genoma das espécies, utilizando o programa *Trinity* na versão 2.4.0 (GRABHERR et al., 2011). A qualidade da montagem dos transcriptomas foi analisada através da métrica de N50, que mostra o tamanho, onde metade das bases montadas no transcriptomas está em *contigs* maiores ou iguais (MARTIN; WANG, 2011). Por fim, a anotação funcional dos transcriptomas foi realizada através do programa BLAST+na versão

2.7.1 (ALTSCHUL et al., 1990) no banco de dados Swiss-Prot (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2016), com *e-value* máximo de 1e-05.

#### 4.3 MAPEAMENTO E QUANTIFICAÇÃO

O mapeamento e a quantificação da abundância das leituras não normalizadas foram realizados através dos programas Bowtie na versão 2.3.4.3 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012) e RSEM na versão 1.3.1 (LI; DEWEY, 2011), respectivamente, calculando valores de FPKM (Fragmentos por Quilobase de transcritos por Milhão de leituras mapeadas). Através do pacote EdgeR, do programa R, foi realizada a análise estatística desses resultados a fim identificar a expressão diferencial dos genes (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2009). O estudo das espécies *N. melanostomus* e *P. semilunaris* (WELLBAND; HEATH, 2017) realizou três réplicas biológicas tanto dos animais em situação controle como daqueles expostos a choque térmico, já no experimento da espécie *S. richardsonii* (BARAT et al., 2016) utilizou-se somente uma amostra para cada condição. Com isso, para as primeiras espécies a expressão diferencial foi aplicada com apoio da comparação entre as amostras, o que possibilita uma melhor análise e reduz falsos positivos. Contudo, para a espécie *S. richardsonii*, a análise não pôde ser realizada dessa maneira, então foi definido manualmente o valor de dispersão de 0.1 (HAAS et al., 2013).

## 4.4 ANÁLISES DOS RESULTADOS

Os resultados foram analisados a fim de identificar os transcritos diferencialmente expressos entre as amostras em situação controle e expostas de cada espécie e verificar possíveis padrões e diferenças de expressão e entre os transcriptomas das espécies. Para tanto foram extraídos os transcritos com maior expressão diferencial, utilizando p-valor de  $1e-3$  para FDR (*False Discovery Rate*) e expressos no mínimo com *fold change*4(HAAS et al., 2013). Com o intuito de identificar, de forma qualitativa, padrões de expressão gênica de peixes em exposição ao calor, as anotações dos transcritos diferencialmente expressos das três espécies foram comparadas através de diagramas de Venn no programa Venny (V.2.1) (OLIVEROS, 2015). Por fim, a literatura sobre o assunto foi analisada e foram verificados os termos de ontologia dos acessos de identificação das proteínas, disponíveis no banco de dados Swiss-Prot (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2016), com a intenção de comparar os resultados obtidos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MONTAGEM DOS TRANSCRIPTOMAS

Na Tabela 2, pode-se verificar a porcentagem de leituras de alta qualidade que resultaram da avaliação da qualidade. Como as espécies *N. melanostomus* e *P. semilunaris* possuíam três amostras para cada situação, na Tabela 2, estão representadas as médias de qualidade das leituras. A partir desses, com a montagem do transcriptoma (Tabela 3) da espécie *S. richardsonii*, obteve-se 91.718 genes, 239.102 transcritos, com tamanho médio de 880,69 pares de base, e tamanho de *contig* N50 de 1.628. Para a espécie *N. melanostomus* foram montados 78.222 genes, 173.857 transcritos, com tamanho médio de 1.192,18 pares de base, e tamanho de *contig* N50 2.309. A montagem do transcriptoma de *P. semilunaris* forneceu 82.054 genes, 167.619 transcritos, com tamanho médio de 1.305,83 pares de base, e tamanho de *contig* N50 de 2.520.

Tabela 2 – Porcentagem de leituras com alta qualidade.

	<i>S. richardsonii</i>	<i>N. melanostomus</i>	<i>P. semilunaris</i>
Total de leituras	276.059.162	285.498.410	284.266.052
Leituras de alta qualidade	224.074.100	240.446.588	241.260.736
Controle	80,97%	84,27%	85,04%
Exposto	81,39%	84,17%	84,67%

Fonte: Elaborada pela autora (2018).

Tabela 3 – Métricas de qualidade das montagens dos transcriptomas das espécies *S. richardsonii*, *N. melanostomus* e *P. semilunaris* produzidas neste trabalho.

Métricas	<i>S. richardsonii</i>	<i>N. melanostomus</i>	<i>P. semilunaris</i>
Genes	91.718	78.222	82.054
Transcritos	239.102	173.857	167.619
Tamanho médio dos transcritos (pb)	880,69	1.192,18	1.305,83
N50	1.628	2.309	2.520

Fonte: Elaborada pela autora (2018).

## 5.2 EXPRESSÃO DIFERENCIAL E ANOTAÇÃO

A expressão diferencial estatisticamente significativa de isoformas e genes (p-valor de  $1e-3$  e expressos no mínimo com *fold change* 4) resultou em 104 genes e isoformas para a espécie *N. melanostomus*, 88 genes e 297 isoformas para *P. semilunaris* e 99 genes e 4.787 isoformas para *S. richardsonii*. A anotação resultou em 73.906 isoformas anotadas para *N. melanostomus*, 74.398 para *P. semilunaris* e 91.859 para *S. richardsonii*. Dessas identificou-se 45 isoformas diferencialmente expressas para *N. melanostomus*, sendo 18 *downregulated* e 27 *upregulated*, 245 para *P. semilunaris*, com 126



*downregulated* e 119 *upregulated*, e, por fim, 3.917 para *S. richardsonii*, sendo 1.864 *downregulated* e 2.053 *upregulated* (Tabela 4).

Tabela 4 – Dados quantitativos de análise de expressão diferencial e anotação funcional dos transcriptomas das três espécies em estudo. Expressão diferencial estatisticamente significativa de isoformas e genes (p-valor de  $1e-3$  e expressos no mínimo *comfold change*4). Anotação realizada no banco de dados Swiss-Prot (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2016).

	<i>N. melanostomus</i>	<i>P. semilunaris</i>	<i>S. richardsonii</i>
Genes diferencialmente expressos	104	88	99
Isoformas diferencialmente expressas	104	297	4.787
Isoformas anotadas	73.906	74.398	91.859
Isoformas diferencialmente expressas e anotadas – <i>downregulated</i>	18	126	1.864
Isoformas diferencialmente expressas e anotadas – <i>upregulated</i>	27	119	2.053

Fonte: Elaborada pela autora (2018).

O total de transcritos anotados está disponível em APÊNDICE A – Tabela 1, enquanto aqueles identificados como diferencialmente expressos estão APÊNDICE B – Tabela 2. Também foram destacados, na Tabela 5, os transcritos *upregulated* da espécie *S. richardsonii* anotados como HSPs.

Como mostrado nas Figuras 4 e 5 não foram encontrados transcritos anotados em comum nas três espécies, sendo na primeira figura representados os transcritos *downregulated* e na segunda os *upregulated*, as repetições de anotação na mesma espécie não foram consideradas. Foram encontradas expressões diferenciais em comum entre as espécies *S. richardsonii* e *N. melanostomus*, sendo dois transcritos para *downregulated* e três para *upregulated*. Já entre *S. richardsonii* e *P. semilunaris*, identificou-se 13 transcritos *downregulated* e 15 *upregulated*. A anotação desses transcritos está apresentada nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 5– Transcritos *upregulated* da espécie *S. richardsonii* anotados como HSPs.

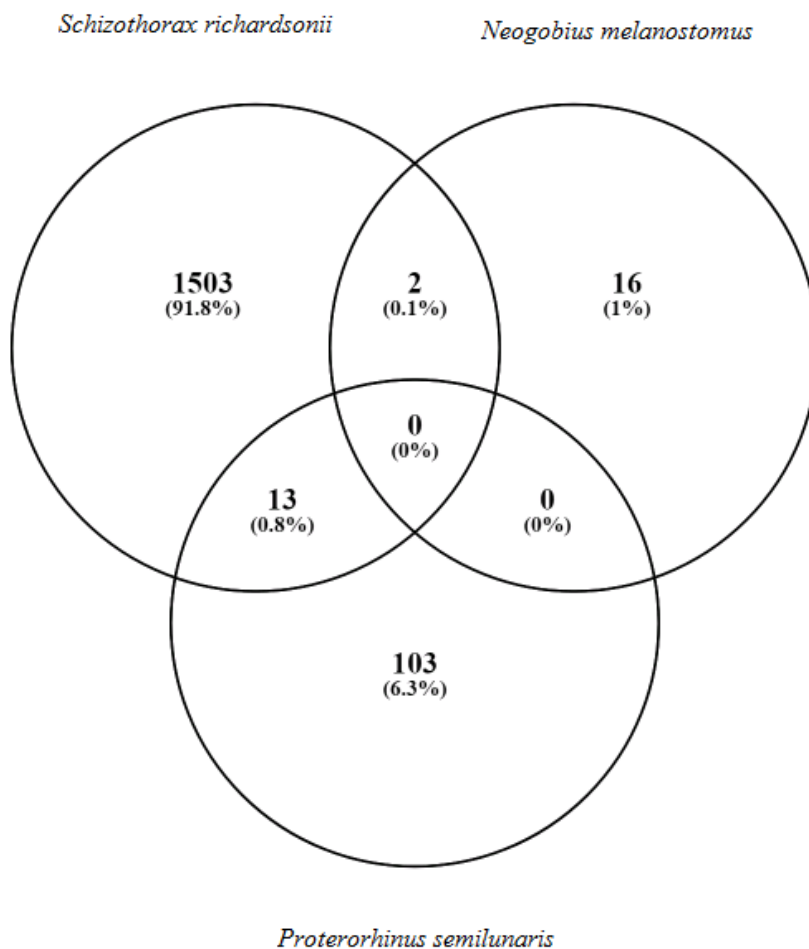
Identificação	Anotação
TRINITY_DN31606_c0_g1_i16	<i>Endoplasmin (Fragment) OS=Mesocricetus auratus OX=10036 GN=HSP90B1 PE=1 SV=1</i>
TRINITY_DN31606_c0_g1_i20	<i>Endoplasmin OS=Gallus gallus OX=9031 GN=HSP90B1 PE=1 SV=1</i>
TRINITY_DN25425_c3_g2_i4	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Gallus gallus OX=9031 GN=HSP90AA1 PE=3 SV=3</i>
TRINITY_DN32954_c2_g1_i2	<i>Endoplasmic reticulum chaperone BiP OS=Mesocricetus auratus OX=10036 GN=HSPA5 PE=1 SV=1</i>
TRINITY_DN28800_c1_g1_i2	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Sus scrofa OX=9823 GN=HSP90AA1 PE=2 SV=3</i>
TRINITY_DN30380_c4_g1_i12	<i>10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Oryzias latipes OX=8090 GN=hspel1 PE=3 SV=1</i>
TRINITY_DN25425_c3_g2_i1	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Gallus gallus OX=9031 GN=HSP90AA1 PE=3 SV=3</i>

TRINITY_DN30380_c4_g1_i16	<i>10 kDa heat shock protein, mitochondrial</i> <i>OS=Oryzias latipes OX=8090 GN=hspel</i> <i>PE=3 SV=1</i>
TRINITY_DN30508_c1_g2_i2	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i> <i>OS=Cricetulus griseus OX=10029</i> <i>GN=HSPD1 PE=2 SV=1</i>
TRINITY_DN31990_c1_g1_i6	<i>Calcium-regulated heat-stable protein 1</i> <i>OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CARHSP1</i> <i>PE=1 SV=2</i>
TRINITY_DN31606_c0_g1_i5	<i>Endoplasmin OS=Gallus gallus OX=9031</i> <i>GN=HSP90B1 PE=1 SV=1</i>
TRINITY_DN31606_c0_g1_i6	<i>Endoplasmin (Fragment) OS=Mesocricetus</i> <i>auratus OX=10036 GN=HSP90B1 PE=1</i> <i>SV=1</i>
TRINITY_DN27443_c0_g2_i2	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i> <i>OS=Rattus norvegicus OX=10116</i> <i>GN=Hspa8 PE=1 SV=1</i>
TRINITY_DN28800_c1_g1_i6	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha 1</i> <i>OS=Danio rerio OX=7955 GN=hsp90a.1</i> <i>PE=1 SV=3</i>
TRINITY_DN30380_c4_g1_i4	<i>10 kDa heat shock protein, mitochondrial</i> <i>OS=Oryzias latipes OX=8090 GN=hspel</i> <i>PE=3 SV=1</i>
TRINITY_DN30380_c4_g1_i7	<i>10 kDa heat shock protein, mitochondrial</i> <i>OS=Oryzias latipes OX=8090 GN=hspel</i> <i>PE=3 SV=1</i>

---

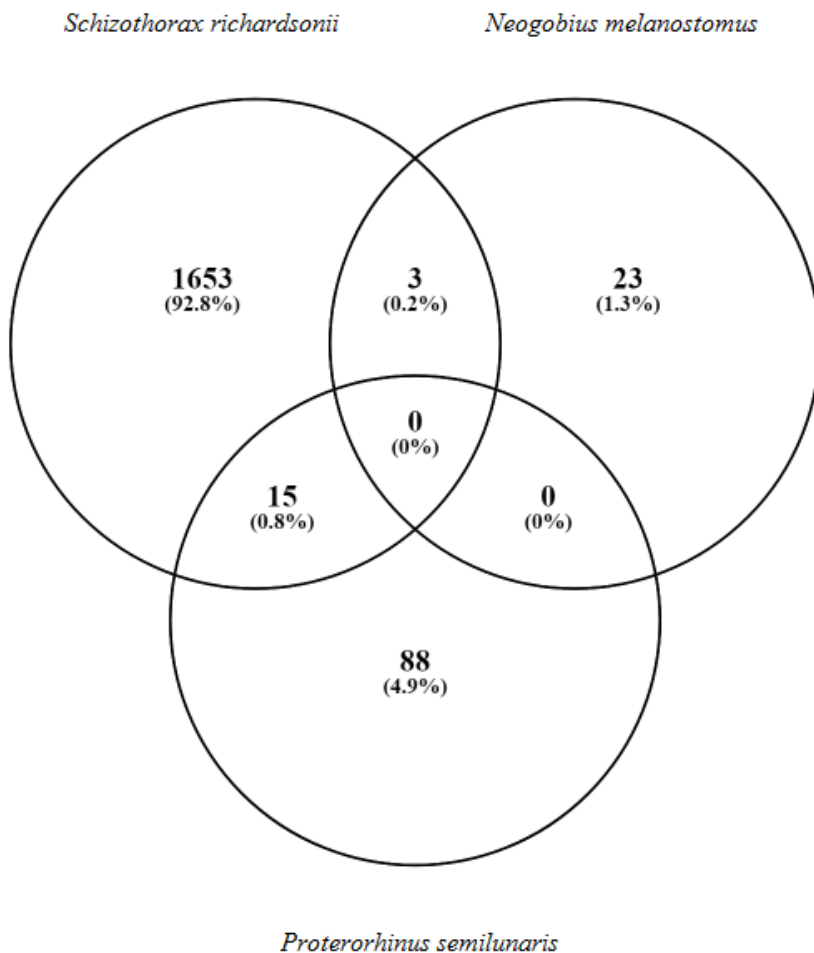
Fonte: Elaborada pela autora (2018).

Figura 4 - Diagrama de Venn dos transcritos *downregulated* em comum entre as espécies em estudo, as repetições de anotação na mesma espécie não foram consideradas.



Fonte: Elaborada pela autora (2018).

Figura 5– Diagrama de Venn dos transcritos *upregulated* em comum entre as espécies em estudo, as repetições de anotação na mesma espécie não foram consideradas.



Fonte: Elaborada pela autora (2018).

Tabela 6 – Anotação dos transcritos *downregulated* em comum entre as espécies estudadas.

---

*S. richardsonii* e *N. melanostomus*

---

*Histone deacetylase 7* OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=HDAC7 PE=1 SV=2

*Protein tweety homolog 3* OS=*Danio rerio* OX=7955 GN=ttyh3 PE=2 SV=1

---

*S. richardsonii* e *P. semilunaris*

---

*LINE-1 retrotransposable element ORF2 protein* OS=*Homo sapiens* OX=9606 PE=1 SV=1

*KAT8 regulatory NSL complex subunit 3* OS=*Danio rerio* OX=7955 GN=kansl3 PE=2 SV=1

*Cell cycle control protein 50A* OS=*Gallus gallus* OX=9031 GN=TMEM30A PE=2 SV=1

*Acyl-coenzyme A thioesterase 4* OS=*Mus musculus* OX=10090 GN=Acot4 PE=1 SV=1

*KH homology domain-containing protein 4* OS=*Danio rerio* OX=7955 GN=khdc4 PE=2 SV=1

*Transcriptional protein SWT1* OS=*Mus musculus* OX=10090 GN=Swt1 PE=2 SV=3

*Complement C3 (Fragment)* OS=*Oncorhynchus mykiss* OX=8022 GN=c3 PE=1 SV=1

*E3 ubiquitin-protein ligase ubr3* OS=*Danio rerio* OX=7955 GN=ubr3 PE=2 SV=2

*Vitamin K-dependent protein C* OS=*Canis lupus familiaris* OX=9615 GN=PROC PE=2 SV=2

*Neurabin-1* OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=PPP1R9A PE=1 SV=2

*Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 19* OS=*Mus musculus* OX=10090 GN=Usp19 PE=1 SV=1

*Sodium-dependent multivitamin transporter* OS=*Rattus norvegicus* OX=10116 GN=Slc5a6 PE=2 SV=1

*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma* OS=*Mus musculus* OX=10090 GN=Camk2g PE=1 SV=1

---

Fonte: Elaborada pela autora (2018).

Tabela 7 – Anotação dos transcritos *upregulated* em comum entre as espécies estudadas.

*S. richardsonii* e *N. melanostomus*

*NAD kinase* OS=*Mus musculus* OX=10090 GN=*Nadk* PE=1 SV=2  
*Alanine aminotransferase 2-like* OS=*Danio rerio* OX=7955 GN=*gpt2l* PE=2 SV=2  
*Cation-independent mannose-6-phosphate receptor* OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=*IGF2R* PE=1 SV=3

*S. richardsonii* e *P. semilunaris*

*Protein FAM210B, mitochondrial* OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=*FAM210B* PE=1 SV=2  
*Annexin A6* OS=*Bos taurus* OX=9913 GN=*ANXA6* PE=1 SV=2  
*Carnitine O-acetyltransferase* OS=*Columba livia* OX=8932 GN=*CRAT* PE=1 SV=1  
*Ephrin type-B receptor 4* OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=*EPHB4* PE=1 SV=2  
*Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial* OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=*AIFM1* PE=1 SV=1  
*Enhancer of polycomb homolog 1* OS=*Mus musculus* OX=10090 GN=*Epc1* PE=1 SV=1  
*RNA-directed DNA polymerase from mobile element jockey* OS=*Drosophila melanogaster* OX=7227 GN=*pol* PE=1 SV=1  
*Intersectin-1* OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=*ITSN1* PE=1 SV=3  
*pre-mRNA 3' end processing protein WDR33* OS=*Mus musculus* OX=10090 GN=*Wdr33* PE=1 SV=1  
*Ubinuclein-2* OS=*Bos taurus* OX=9913 GN=*UBN2* PE=3 SV=1  
*Intersectin-1* OS=*Mus musculus* OX=10090 GN=*Itsn1* PE=1 SV=2  
*Cullin-9* OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=*CUL9* PE=1 SV=2  
*CCR4-NOT transcription complex subunit 1* OS=*Danio rerio* OX=7955 GN=*cnot1* PE=2 SV=1  
*Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 2* OS=*Danio rerio* OX=7955 GN=*spred2* PE=2 SV=1  
*Transcription factor SPT20 homolog* OS=*Gallus gallus* OX=9031 GN=*SUPT20H* PE=2 SV=1

Fonte: Elaborada pela autora (2018).

## 6 DISCUSSÃO

Entender os constituintes de um transcriptoma, conjunto de RNA mensageiro provenientes de genes expressos, pode mostrar-nos o escopo das ações celulares. Assim como, proporcionar informações acerca de níveis de expressão gênica em condições ambientais ou experimentais (BILYK; CHENG, 2013). Nos trabalhos onde os dados experimentais foram obtidos (WELLBAND; HEATH, 2017 e BARAT, et. al., 2016) utilizou-se diferentes programas para montagem e análise dos dados. Portanto, a padronização de metodologia aplicada neste trabalho, na análise das três espécies em estudo, foi de extrema importância, já que assim pôde-se comparar os resultados das diferentes espécies evitando vieses de interpretação dos dados. Isso, pois os programas para montagem de transcriptomas aplicam variadas estratégias analíticas e parâmetros em suas etapas. Essas divergências podem impactar a qualidade dos transcriptomas e das inferências de expressão diferencial dos genes (VIJAY et al., 2012).

Wellband e Heath, (2017) realizaram réplicas biológicas para o sequenciamento dos transcritos, assim, na análise da expressão diferencial das espécies *N. melanostomus* e *P. semilunaris* foi possível definir o nível de dispersão através da comparação entre as amostras. Essa etapa é importante porque pode haver variações entre as amostras que não representam diferenças de expressão biológica, mas que podem ter sido geradas por causas técnicas, como na preparação das bibliotecas. Para *S. richardsonii*, não foi possível realizar esse processo, pois em Barat et al. (2016) foram sequenciadas apenas uma amostra para cada condição experimental então, a dispersão foi definida tecnicamente em 0,1 (HAAS et al., 2013; CHEN et al., 2018). Pôde-se perceber uma grande quantidade de isoformas diferencialmente expressas em *S. richardsonii* quando comparados às outras espécies, o que pode ter sido provocado devido à falta de réplicas, gerando falsos positivos. Em Barat et al. (2016) foram encontrados 65 genes diferencialmente expressos, valor próximo ao do presente trabalho, onde observou-se 99 genes, porém não há informações quanto ao número de isoformas diferencialmente expressas no trabalho para que possa haver comparação com os resultados gerados (Tabela 4).

Os transcritos foram anotados no programa Swiss-Prot, o qual possui apenas sequências com anotação de alta qualidade, pois são anotadas e revisadas manualmente (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2016). Com isso, obteve-se uma análise mais restrita e conservadora, a fim de evitar, na medida do possível, vieses referentes à diferença de



procedimentos realizados dos experimentos, os efeitos de lote (HUO; SONG; TSENG, 2017).

Os organismos, mesmo com genótipos idênticos, podem alterar aspectos de seus fenótipos de acordo com estímulos do ambiente, assim define-se a plasticidade (WEST-EBERHARD, 2003 apud WELLBAND; HEATH, 2017). Essa pode proporcionar uma vantagem em relação ao *fitness* dos organismos e representa um fator importante para organismos em situações de mudanças ambientais (SCHLICHTING; SMITH, 2002; WELLBAND; HEATH, 2017). A espécie *S. richardsonii* é endêmica da região do Himalaia e Sub-Himalaia, vive em temperaturas de aproximadamente 10 °C. Pode prosperar a 5 °C e possuem alguma plasticidade em relação a temperaturas mais elevadas, sobrevivendo quando expostas ocasionalmente em águas com temperatura maiores ou iguais a 20 °C (BARAT et al., 2016). *N. melanostomus* e *P. semilunaris* são nativas da região de Ponto-Caspian na Europa Oriental, foram detectadas em 1990 pela primeira vez nos Grandes Lagos (EUA), local onde os experimentos de transcriptoma foram realizados. Presume-se que se introduziram através da água de lastro dos navios (BROWN; STEPIEN, 2008). Desde então, *N. melanostomus* espalhou-se por toda a região, com populações de alta densidade, já *P. semilunaris* restringiu-se ao local de introdução, com pequenas populações (LYNCH; MENSINGER, 2011; WOLFE; MARSDEN, 1998). Essa distribuição diferencial entre as espécies é explicada através da análise de plasticidade dos transcriptomas dessas espécies realizada por Wellband e Heath (2017). Os autores observaram que *N. melanostomus* possui maior plasticidade em situações de alterações de temperatura, pois apresenta maior possibilidade de resposta, além de possuir respostas adaptativas que mantém ou recuperam a homeostase nesses momentos.

Wellband e Heath (2017), ao analisarem os transcriptomas das duas espécies presentes nos Grandes Lagos (EUA), não encontraram representações significativas de termos de ontologia gênica para nenhum processo biológico na espécie *N. melanostomus*. Essa espécie apresentou apenas: redução no ciclo e divisão celular, na replicação do DNA e em proteólise mediada por ubiquitina, processo intensificado em situações de estresse (FLICK; KAISER, 2012). Percebe-se, no APÊNDICE B – Tabela 2, transcritos *upregulated* com funções compartilhadas, como redução do ciclo celular e da proteólise de proteínas, mas também relacionadas à biossíntese de proteínas. As primeiras classes descritas são representadas por Serina-piruvato aminotransferase, enzima catalizadora de conversão reversível de Serina

e Piruvato em Hidroxipiruvato (LAHMI et al., 2006) e Alanina aminotransferase *2-like*, que catalisa a transaminação reversível entre Alanina em Oxoglutarato, para formar Piruvato em Glutamato (YANG et al., 2002). Na redução do ciclo celular e da proteólise de proteínas, evidencia-se a proteína *Growth arrest and DNA damage-inducible protein*, induzida por dano no DNA, deprivação de crescimento e outras formas de estresse celular (BRUSH; WEISER; SHENOLIKAR, 2003). Outra proteína, que se alinha à descrição é Inibidor da Inter- $\alpha$ -tripsina de cadeia pesada H2, com função relacionada ao metabolismo de hialurona e inibição de proteases (ZHANG, 2003). Por fim, ocorre a ausência de HSPs, chaperonas que auxiliam no dobramento e degradação de proteínas (BARAT et al., 2016; JESUS et al., 2016; LIU et al., 2013; PRADO-LIMA; VAL, 2016). Esse perfil de expressão mostra uma adaptação da homeostase em relação à mudança de temperatura, pode ser visto em organismos adaptados ou aclimatados ao estresse térmico (OOMEN; HUTCHINGS, 2017). Nesse sentido, a espécie *Pagothenia borchgrevinki*, quando exposta a estresse térmico apresenta expressão reduzida de proteínas relacionada à proteólise e ciclo celular (BILYK; CHENG, 2014). Em Logan e Somero (2010), onde indivíduos de *Gillichthys mirabilis* foram expostos por três semanas a estresse térmico ocorreu aumento na biossíntese de proteínas e ausência de HSPs. Também, em *Gasterosteus aculeatus*, após aclimação durante o desenvolvimento por três gerações, apresentou-se aumento na biossíntese de proteínas (SHAMA, 2016). Assim, é possível que *N. melanostomus* seja uma espécie que possui maior plasticidade para adaptação ao estresse térmico em comparação com as demais espécies analisadas no presente estudo.

Em Wellband e Heath (2017), para a espécie *P. semilunaris*, obteve-se aumento da atividade imune e diminuição da transcrição. No presente trabalho, esse perfil é presente (APÊNDICE B – Tabela 2), com o aumento da expressão da Cadeia- $\alpha$  do Componente C8 do Complemento (HADDERS; BERINGER; GROS, 2007) e do Repressor Transcricional CTCF (XIAO et al., 2015). Assim como, regulação negativa da Proteína Transcricional SWT1, que funciona como ativadora da transcrição (RÖTHER et al., 2006). O aumento da resposta imune frente ao estresse térmico acontece em *Acanthochromis polyacanthus*, *Melanotaenia duboulayi* e *S. richardsonii* (VEILLEUX et al., 2015; SMITH; BERNATCHEZ; BEHEREGARAY, 2013; BARAT et al., 2016). Mudanças na regulação transcricional foram encontradas também em *Danio rerio*, *Acanthochromis polyacanthus*, *Squalius*

*carolitertii* e *Squalius torgalensis* (LONG et al., 2013; VEILLEUX et al., 2015; JESUS et al., 2016).

Em espécies sensíveis ao estresse térmico, as chaperonas HSPs têm alta representação entre os transcritos *upregulated* (BARAT et al., 2016; JESUS et al., 2016; LIU et al., 2013; PRADO-LIMA; VAL, 2016). A espécie *S. richardsonii* apresentou 16 HSPs *upregulated*, destacados na Tabela 5. Em Barat et al. (2016), também houve aumento da expressão de HSPs, sendo nesse apenas seis identificadas. O mesmo não ocorreu em *P. semilunaris*, tanto no presente trabalho como em Wellband e Heath (2017) não foram identificadas HSPs. Esse resultado pode ter relação com a restrição das análises, já que diferentemente de *S. richardsonii* essa espécie possuía réplicas biológicas para a análise de expressão diferencial. Para melhor entender a relação das HSPs nessas espécies seria importante realizar réplicas biológicas na experimentação e assim, analisar a expressão diferencial em *S. richardsonii*. Em Barat et al. (2016) observou-se o aumento da expressão de sete proteínas do complemento, resultado também observado no atual trabalho, mas com 28 proteínas relacionadas ao complemento. Em ambos, a maioria dessas são identificadas como Complemento C3, componente central para a ativação das vias do Sistema Complemento (MERLE et al., 2016).

Analisando a distribuição de *P. semilunaris* e *S. richardsonii* percebe-se que esses possuem menor plasticidade, quando comparadas à *N. melanostomus*. Essa característica pode ter relação como perfil de expressão diferencial observado nas Figuras 4 e 5 e nas Tabelas 6 e 7, onde essas espécies apresentam mais transcritos em comum. Nessas, em relação à resposta ao estresse térmico, destaca-se a expressão diferencial *upregulated* de Anexina A6 e Fator de Indução de Apoptose.

A Anexina A6 é uma proteína hidrofílica, que tem relação com o metabolismo de lipídeos, com o transporte de íons, pois modula o transporte de cálcio, e com a estrutura da célula, já que auxilia na estruturação e ligação de membranas, na formação e agregação de vesículas e liga-se com a actina no citoesqueleto. Em situação de estresse térmico, encontra-se aumento no metabolismo de lipídeos, que pode ocorrer por serem a fonte de energia disponível, em função da hipóxia provocada pelo aumento da temperatura. Observou-se a mesma resposta nas espécies *Trematomus bernacchi* e *Gillichthys mirabilis* (BARAT et al., 2016; HUTH; PLACE, 2016; BUCKLEY; GRACEY; SOMERO 2006). Além disso, a temperatura pode interferir na estabilidade e integridade do citoesqueleto, pois um possível efeito secundário ao estresse térmico é o choque osmótico, assim, células osmoticamente desreguladas podem sofrer reorganização do citoesqueleto a fim de

modular o volume celular e recuperar o balanço osmótico (KASSHAN et al., 2007; CIANO et al., 2002; BUCKLEY; GRACEY; SOMERO, 2006). O aumento da expressão de genes relacionados à construção e organização do citoesqueleto foi observado nos peixes: *Pomacentrus moluccensis*, *Ictalurus punctatus*, *Gillichthys mirabilis* e *Trematomus bernacchii* (KASSHAN et al., 2007; LIU et al., 2013; BUCKLEY; GRACEY; SOMERO, 2006; BUCKLEY; SOMERO, 2008). As membranas biológicas são extremamente importantes para lidar com situações adversas, já que suas estruturas são barreiras físicas para a difusão de solutos e mediam seu transporte, regulam a utilização de energia estocada em gradiente de íons transmembrana e providenciam e organizam as vias de sinalização. Por isso, em situações de estresse térmico a manutenção das membranas representa um grande desafio aos ectotérmicos, como os peixes, pois precisam reestruturar suas membranas para que os lipídeos com propriedades físicas apropriadas estejam de acordo com a condição térmica. Assim, o aumento do metabolismo de lipídeos modulado pela Anexina A6 pode estar relacionado com as atividades de estruturação celular (HAZEL, 1995).

Situações de estresse térmico podem causar danos, que os mecanismos de recuperação da maquinaria celular são incapazes de reverter, então ocorrem os processos de apoptose (BUCKLEY; GRACEY; SOMERO, 2006). O transcrito Fator de Indução de Apoptose está envolvido nos processos de apoptose através da indução de condensação de cromatina periférica independente de caspase e fragmentação em larga escala do DNA. Ainda, pode participar na regulação da permeabilização da membrana mitocondrial apoptótica e apresenta uma atividade de NADH oxidase (CANDÉ et al., 2001). Transcritos relacionados com a apoptose foram encontrados em Barat et al. (2016) e também em estudos de estresse térmico realizados com *Gillichthys mirabilis* e *Trematomus bernacchii* (BUCKLEY; GRACEY; SOMERO, 2006; BUCKLEY; SOMERO, 2008).

O aumento da temperatura global é uma das principais preocupações apontadas no IPCC (2014). Os resultados obtidos podem ser utilizados em futuros trabalhos de conservação, como a possível utilização da proteína Anexina A6 como biomarcador de estresse térmico. Para tanto, é necessário que sejam realizados trabalhos futuros aplicando uma maior diversidade de peixes e métodos análise de ortologia e de metanálise, a fim de encontrar mais proteínas em comum, através do aumento do poder estatístico, evitar vieses de anotação gerados pelos bancos de dados e por efeitos de lote gerados por

diferentes métodos utilizados nos experimentos (YA; SMITH, 2014; HUO; SONG; TSENG, 2017).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A principal causa para o aumento das mudanças climáticas, como o efeito estufa e os acréscimos de temperatura, são as atividades humanas, como a industrialização e a agropecuária, que geram emissão de gases e desmatamento (GUNSTER, 2016; GONZÁLEZ; FROSTELL; CARLSSON-KANYAMA, 2011; MCMICHAEL et al., 2007; IPCC, 2014).

A temperatura é um dos principais fatores influenciados com as mudanças climáticas (IPCC, 2014). Seu aumento afeta a distribuição, fisiologia e comportamento dos organismos, principalmente das espécies ectotérmicas como a maioria dos peixes (DEUTSCH et al., 2008; THOMAS et al., 2004). No presente estudo, pode-se verificar a influência da elevação da temperatura ambiental em peixes, principalmente, para *P. semilunaris* e *S. richardsonii*, que se mostraram mais sensíveis, por serem menos plásticas. A estruturação do citoesqueleto e da membrana celular, representada nessas espécies pelo aumento de transcritos da proteína *Annexin A6*, mostraram-se como componentes de extrema importância em situações de estresse térmico, tanto no presente estudo como na literatura sobre o assunto. As vias metabólicas e proteínas relacionadas a essas funções podem ser interessantes biomarcadores de estresse térmico. Porém, é necessário realizar estudos com mais espécies de peixes e que incluam análises de ortologia e de metanálise, a fim de evitar vieses e obter mais características de respostas em comum entre as espécies (YA; SMITH, 2014; HUO; SONG; TSENG, 2017).

Os transcriptomas podem auxiliar na análise da resposta dos táxons sob diferentes condições, através da identificação de biomarcadores, da análise de perfis fisiológicos, de mecanismos bioquímicos e moleculares por trás de uma característica fenotípica ou uma habilidade funcional dos organismos (CONNON et al., 2018). Com isso, podem fornecer informações relevantes para auxiliar na compreensão das diferenças moleculares que permeiam as mudanças adaptativas, fator importante ao abordar as alterações climáticas (BILYK; CHENG, 2013). Para tanto, é necessária a comunicação entre as pesquisas e as políticas de conservação, principal barreira para que essas informações sejam aplicadas de maneira eficaz (GARNER et al. 2016). Contudo, o ímpeto para tal mudança não virá de governos ligados ao neoliberalismo, corporações e elites políticas. Por isso, precisamos além de realizar pesquisas voltadas à conservação, utilizar os conhecimentos gerados para fortalecer os movimentos que lutam por justiça social, igualdade e participação social, promovida através da democracia (GUNSTER, 2016).

## 8 REFERÊNCIAS

AKBARZADEH, Arash; LEDER, Erica H.. Acclimation of killifish to thermal extremes of hot spring: Transcription of gonadal and liver heat shock genes. **Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [s.l.], v. 191, p.89-97, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.008>.

ALTSCHUL, Stephen F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 215, n. 3, p.403-410, out. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2).

BARAT, Ashoktaru et al. Transcriptional response to heat shock in liver of snow trout (*Schizothorax richardsonii*)—a vulnerable Himalayan Cyprinid fish. **Functional & Integrative Genomics**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.203-213, 26 jan. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10142-016-0477-0>.

BILYK, Kevin T.; CHENG, C.-h. Christina. RNA-seq analyses of cellular responses to elevated body temperature in the high Antarctic cryopelagic nototheniid fish *Pagothenia borchgrevinkii*. **Marine**

**Genomics**, [s.l.], v. 18, p.163-171, dez. 2014. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2014.06.006>.

BILYK, Kevin T; CHENG, C-h. Model of gene expression in extreme cold - reference transcriptome for the high-Antarctic cryopelagic notothenioid fish *Pagothenia borchgrevinki*. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.634-650, 2013. Springer Nature.  
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-634>.

BRADSHAW, W. E.; HOLZAPFEL, C. M.. Genetic response to rapid climate change: it's seasonal timing that matters. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.157-166, jan. 2008. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03509.x>.

BRAUER, Chris J.; UNMACK, Peter J.; BEHEREGARAY, Luciano B.. Comparative ecological transcriptomics and the contribution of gene expression to the evolutionary potential of a threatened fish. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 26, n. 24, p.6841-6856, dez. 2017. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/mec.14432>.

BRUSH, Matthew H.; WEISER, Douglas C.; SHENOLIKAR, Shirish. Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Target Protein Phosphatase 1 $\alpha$  to the Endoplasmic Reticulum and Promotes the Phosphorylation of the  $\alpha$  Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2. **American Society For Microbiology**, [s.i.], v. 23, n. 4, p.1292-1303, fev. 2003.

BROWN, Joshua E.; STEPIEN, Carol A.. Invasion genetics of the Eurasian round goby in North America: tracing sources and spread patterns. **Molecular Ecology**, [s.l.], p.64-79, dez. 2008. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.2008.04014.x>.

BUCKLEY, Bradley A.; GRACEY, Andrew Y.; SOMERO, George N.. The cellular response to heat stress in the goby *Gillichthys mirabilis*: a cDNA microarray and protein-level analysis. **Journal Of Experimental Biology**, [s.l.], v. 209, n. 14, p.2660-2677, 15 jul. 2006. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.02292>.

BUCKLEY, Bradley A.; SOMERO, George N.. CDNA microarray analysis reveals the capacity of the cold-adapted Antarctic fish *Trematomus bernacchii* to alter gene expression in response to heat

stress. **Polar Biology**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.403-415, 7 nov. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00300-008-0533-x>.

CANDÉ, Céline et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. **Biochimie**, [s.i.], v. 84, n. , p.215-222, dez. 2001.

CHEN, Yunshunn et al. EdgeR: differential expression analysis of digital gene expression data. [s.i.], abr. 2018.

CIANO, Caterina di et al. Osmotic stress-induced remodeling of the cortical cytoskeleton. **American Journal Of Physiology-cell Physiology**, [s.l.], v. 283, n. 3, p.850-865, set. 2002. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00018.2002>.

CLARKE, A.. Seasonal Acclimatization and Latitudinal Compensation in Metabolism: Do They Exist?. **Functional Ecology**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.139-149, 1993. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2389880>.

CONNON, Richard E. et al. The utility of transcriptomics in fish conservation. **The Journal Of Experimental Biology**, [s.l.], v. 221, n. 2, p.1-8, 15 jan. 2018. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.148833>.

DEUTSCH, C. A. et al. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 105, n. 18, p.6668-6672, 5 maio 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0709472105>.

DULVY, Nicholas K. et al. Climate change and deepening of the North Sea fish assemblage: a biotic indicator of warming seas. **Journal Of Applied Ecology**, [s.l.], v. 45, n. 4, p.1029-1039, ago. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01488.x>.

FEDER, Martin E.; HOFMANN, Gretchen E.. HEAT-SHOCK PROTEINS, MOLECULAR CHAPERONES, AND THE STRESS RESPONSE: Evolutionary and Ecological Physiology. **Annual Review Of Physiology**, [s.l.], v. 61, n. 1, p.243-282, mar. 1999. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243>.



FLICK, Karin; KAISER, Peter. Protein degradation and the stress response. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, [s.l.], v. 23, n. 5, p.515-522, jul. 2012. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.019>

FREI, Christoph et al. Future change of precipitation extremes in Europe: Intercomparison of scenarios from regional climate models. **Journal Of Geophysical Research**, [s.l.], v. 111, n. 6, p.1-22, 2006. American Geophysical Union (AGU).  
<http://dx.doi.org/10.1029/2005jd005965>.

GARNER, Brittany A. et al. Genomics in Conservation: Case Studies and Bridging the Gap between Data and Application. **Trends In Ecology & Evolution**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.81-83, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2015.10.009>.

GILLOOLY, J. F.. Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate. **Science**, [s.l.], v. 293, n. 5538, p.2248-2251, 21 set. 2001. American Association for the Advancement of Science (AAAS).  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1061967>.

GLOBALBIODIVERSITYINFORMATIONFACILITY. **Taxonomy**. 2 018. Disponível em:  
 <[https://www.gbif.org/occurrence/taxonomy?taxon\\_key=2379089](https://www.gbif.org/occurrence/taxonomy?taxon_key=2379089)>.  
 Acesso em: 29 out. 2018.

GONZÁLEZ, Alejandro D.; FROSTELL, Björn; CARLSSON-KANYAMA, Annika. Protein efficiency per unit energy and per unit greenhouse gas emissions: Potential contribution of diet choices to climate change mitigation. **Food Policy**, [s.l.], v. 36, n. 5, p.562-570, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodpol.2011.07.003>.

GRABHERR, Manfred G et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 29, n. 7, p.644-652, 15 maio 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1883>.

GUNSTER, Shane. This changes everything: capitalism vs the climate. **Environmental Communication**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.136-138, 29 jun. 2016. Informa UK Limited.  
<http://dx.doi.org/10.1080/17524032.2016.1196534>.

HAAS, Brian J et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 8, n. 8, p.1494-1512, 11 jul. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.084>.

HADDERS, M. A.; BERINGER, D. X.; GROS, P.. Structure of C8 - MACPF Reveals Mechanism of Membrane Attack in Complement Immune Defense. **Science**, [s.l.], v. 317, n. 5844, p.1552-1554, 14 set. 2007. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1147103>.

HASSOL, Susan Joy. **Impacts of a warming arctic**: Artic climate impact assessment. [s.i]: Cambridge University Press, 2004.

HARTL, F. Ulrich; HAYER-HARTL, Manajit. Molecular Chaperones in the Cytosol:: From Nascent Chain to Folded Protein. **Science**, [s.i], v. 295, n. 5561, p.1852-1858, mar. 2002.

HAZEL, Jeffrey R.. THERMAL ADAPTATION IN BIOLOGICAL MEMBRANES: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation?. **Annual Review Of Physiology**, [s.i.], v. 57, p.19-42. 1995.

HULME, Milke et al. **Climate Change Scenarios for the United Kingdom**: the UKCIP02 Scientific Report, Tyndall. Centre for Climate Change Research, School of Environmental Sciences, University of East Anglia, Norwich, UK. 120 pp. 2002.

HUO, Zhiguang; SONG, Chi; TSENG, George. Bayesian latente hierarchical model for transcriptomic meta-analysis to detect biomarkers with clustered meta-patterns of diferential expression signals. **Annals Of Aplied Statistics**, [s.I.], n. 1, p.1-27, jul.2017.

HOFFMANN, A. A. Acclimation: increasing survival at a cost. **Trends In Ecology & Evolution**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.1-2, jan. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-5347\(00\)88949-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-5347(00)88949-1).

HUTH, Troy J; PLACE, Sean P. De novo assembly and characterization of tissue specific transcriptomes in the emerald notothen, *Trematomus*

bernacchii. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.805-818, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-805>.

JESUS, Tiago filipe et al. Transcriptome profiling of two Iberian freshwater fish exposed to thermal stress. **Journal Of Thermal Biology**, [s.l.], v. 55, p.54-61, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.11.009>.

KASSAHN, Karin S et al. From transcriptome to biological function: environmental stress in an ectothermic vertebrate, the coral reef fish *Pomacentrus moluccensis*. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.358-374, 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-358>.

KIM, Sin-yeon et al. Transcriptional mechanisms underlying life-history responses to climate change in the three-spined stickleback. **Evolutionary Applications**, [s.l.], v. 10, n. 7, p.718-730, 15 maio 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/eva.12487>.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Fourth Assessment Report**. 2007. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/report/ar4/>>. Acesso em: 24 maio 2018.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Fifth Assessment Report**. 2014. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/report/ar5/>>. Acesso em: 22 maio 2018.

LAHMI, R. et al. Alanine Dehydrogenase Activity Is Required for Adequate Progression of Phycobilisome Degradation during Nitrogen Starvation in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 188, n. 14, p.5258-5265, 30 jun. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00209-06>.

LANGMEAD, Ben; SALZBERG, Steven L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.357-359, 4 mar. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1923>.

LI, Li; STOECKERT JUNIOR, Christian J.; ROOS, David S. OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. **Genome Research**, [s.l.], v. 13, n. 9, p.2178-2189, 1 set. 2003. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.1224503>.

LI, Yongjuan et al. Transcriptome analysis provides insights into hepatic responses to moderate heat stress in the rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ). **Gene**, [s.l.], v. 619, p.1-9, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.03.041>.

LIU, Shikai et al. RNA-Seq reveals expression signatures of genes involved in oxygen transport, protein synthesis, folding, and degradation in response to heat stress in catfish. **Physiological Genomics**, [s.l.], v. 45, n. 12, p.462-476, 15 jun. 2013. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00026.2013>.

LYNCH, Michael P.; MENSINGER, Allen F.. Seasonal abundance and movement of the invasive round goby (*Neogobius melanostomus*) on rocky substrate in the Duluth-Superior Harbor of Lake Superior. **Ecology Of Freshwater Fish**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.64-74, 4 ago. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0633.2011.00524.x>.

LOGAN, Cheryl A.; SOMERO, George N.. Transcriptional responses to thermal acclimation in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper 1864). **American Journal Of Physiology-regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [s.l.], v. 299, n. 3, p.843-852, set. 2010. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00306.2010>.

LOGAN, C. A.; BUCKLEY, B. A.. Transcriptomic responses to environmental temperature in eurythermal and stenothermal fishes. **Journal Of Experimental Biology**, [s.l.], v. 218, n. 12, p.1915-1924, 1 jun. 2015. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.114397>.

LONG, Yong et al. Transcriptomic characterization of cold acclimation in larval zebrafish. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.612-628, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-612>.

MALONEY, Alison; WORKMAN, Paul. HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. **Expert Opinion On Biological Therapy**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.3-24, jan. 2002. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.2.1.3>.

MARTIN, Jeffrey A.; WANG, Zhong. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 12, n. 10, p.671-682, 7 set. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3068>.

MCMICHAEL, Anthony J et al. Food, livestock production, energy, climate change, and health. **The Lancet**, [s.l.], v. 370, n. 9594, p.1253-1263, out. 2007. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61256-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61256-2).

MERLE, Nicolas S. et al. Complement System Part I: molecular Mechanisms of Activation and Regulation. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 6, p.1-30, 2 jun. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00262>.

NARUM, Shawn R. et al. Thermal adaptation and acclimation of ectotherms from differing aquatic climates. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 22, n. 11, p.3090-3097, 1 mar. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.12240>.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Sequence Read Archive (SRA)**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>>. Acesso em: 18 jul. 2018.

OLIVEROS, Juan Carlos. **Venny**: An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.. 2015. Disponível em: <<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>>. Acesso em: 22 out. 2018.

OOMEN, Rebekah A.; HUTCHINGS, Jeffrey A.. Transcriptomic responses to environmental change in fishes: Insights from RNA sequencing. **Facets**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.610-641, set. 2017. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/facets-2017-0015>.

PATEL, Ravi K.; JAIN, Mukesh. NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 2, 1 fev. 2012. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030619>.

PODRABSKY, Jason E.; SOMERO, George N.. Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus*

limnaeus. **Journal Of Experimental Biology**, [s.l.], v. 207, n. 13, p.2237-2254, 1 jun. 2004. The Company of Biologists.  
<http://dx.doi.org/10.1242/jeb.01016>.

PRADO-LIMA, Marcos; VAL, Adalberto Luis. Transcriptomic Characterization of Tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) Exposed to Three Climate Change Scenarios. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.1-21, 28 mar. 2016. Public Library of Science (PLOS).  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0152366>.

RAHMSTORF, S.; COUMOU, D.. Increase of extreme events in a warming world. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 108, n. 44, p.17905-17909, 24 out. 2011. Proceedings of the National Academy of Sciences.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1101766108>.

RIJNSDORP, Adriaan D. et al. Resolving the effect of climate change on fish populations. **Journal Of Marine Science**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.1570-1583, abr. 2009.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K.. EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.139-140, 11 nov. 2009. Oxford University Press (OUP).  
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.

RÖTHER, Susanne et al. Swt1, a Novel Yeast Protein, Functions in Transcription. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 281, n. 48, p.36518-36525, 9 out. 2006. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).  
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m607510200>.

SAPOTA, Mariusz R.. Invasive Alien Species Fact Sheet: *Neogobius melanostomus*. **Nobanis**, Gdynia, p.1-11, 2012.

SCHLICHTING, Carl D.; SMITH, Harry. Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. **Evolutionary Ecology**, [s.l.], v. 16, n. 3, p.189-211, maio 2002. Springer Nature.  
<http://dx.doi.org/10.1023/a:1019624425971>.

SHAFER, Aaron B.a. et al. Genomics and the challenging translation into conservation practice. **Trends In Ecology & Evolution**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.78-87, fev. 2015. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.11.009>.

SHAMA, Lisa N.s. et al. Transgenerational effects persist down the maternal line in marine sticklebacks: gene expression matches physiology in a warming ocean. **Evolutionary Applications**, [s.l.], v. 9, n. 9, p.1096-1111, 28 fev. 2016. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/eva.12370>.

SMITH, Steve; BERNATCHEZ, Louis; BEHEREGARAY, Luciano B. RNA-seq analysis reveals extensive transcriptional plasticity to temperature stress in a freshwater fish species. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.375-387, 2013. Springer Nature.  
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-375>.

SOULÉ, Michael E.. What Is Conservation Biology? **Bioscience**, [s.l.], v. 35, n. 11, p.727-734, dez. 1985. Oxford University Press (OUP).  
<http://dx.doi.org/10.2307/1310054>.

The Fish Collection At The Zoologische Staatssammlung. **Proterorhinus semilunaris (Heckel, 1837)**. 2004. Disponível em: <<https://www.gbif.org/occurrence/1265782902>>. Acesso em: 29 out. 2018.

THOMAS, Chris D. et al. Extinction risk from climate change. **Nature**, [s.l.], v. 427, n. 6970, p.145-148, 8 jan. 2004. Springer Nature.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature02121>.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.158-169, 29 nov. 2016. Oxford University Press (OUP).  
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw1099>.

UNIVERSITY OF KANSAS BIODIVERSITY INSTITUTE. **Schizothorax richardsonii (Gray, 1832)**. 2013. Disponível em: <<https://www.gbif.org/occurrence/656963525>>. Acesso em: 29 out. 2018.

VEILLEUX, Heather D. et al. Molecular processes of transgenerational acclimation to a warming ocean. **Nature Climate Change**, [s.l.], v. 5, n. 12, p.1074-1078, 20 jul. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nclimate2724>.

VIJAY, Nagarjun et al. Challenges and strategies in transcriptome assembly and differential gene expression quantification. A comprehensive in silico assessment of RNA-seq experiments. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.620-634, 24 set. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.12014>.

WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.57-63, jan. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2484>.

WALTHER, Gian-reto et al. Ecological responses to recent climate change. **Nature**, [s.l.], v. 416, n. 6879, p.389-395, mar. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/416389a>.

WINDISCH, Heidrun Sigrid et al. Thermal acclimation in Antarctic fish: transcriptomic profiling of metabolic pathways. **American Journal Of Physiology-regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [s.l.], v. 301, n. 5, p.1453-1466, nov. 2011. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00158.2011>.

WELLBAND, Kyle W.; HEATH, Daniel D.. Plasticity in gene transcription explains the differential performance of two invasive fish species. **Evolutionary Applications**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.563-576, 25 abr. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/eva.12463>.

WOLFE, Kirby R.; MARSDEN, Ellen J.. Tagging Methods for the Round Goby (*Neogobius melanostomus*). **Journal Of Great Lakes Research**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.731-735, jan. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0380-1330\(98\)70857-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0380-1330(98)70857-3).

XIAO, Tiaojiang et al. CTCF Recruits Centromeric Protein CENP-E to the Pericentromeric/Centromeric Regions of Chromosomes through Unusual CTCF-Binding Sites. **Cell Reports**, [s.l.], v. 12, n. 10, p.1704-1714, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.005>.



YANG, Jiming. The dominant fish fauna in the North Sea and its determination. **Journal Of Fish Biology**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.635-643, jun. 1982. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1982.tb03973.x>.

YANG, Rong-ze et al. CDNA Cloning, Genomic Structure, Chromosomal Mapping, and Functional Expression of a Novel Human Alanine Aminotransferase. **Genomics**, [s.l.], v. 79, n. 3, p.445-450, mar. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/geno.2002.6722>.

ZHANG, Jingshu. **Development of an in-vitro dendritic cell model for studying dengue virus and host interaction**.2003. 295 f. Tese (Doutorado), The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, 2003.

## APÊNDICE A – Tabela 1

Tabela 1 - Total de transcritos anotados das três espécies estudadas.

<https://github.com/juliechristinemartins/appendicestccjuliecmartins/raw/master/AppendiceA.7z>

## **APÊNDICE B – Tabela 2**

Tabela 2 - Total de transcritos anotados das três espécies estudadas, identificados como diferencialmente expressos.

<https://github.com/juliechristinemartins/apendicestccjuliecmartins/raw/master/AppendiceB.pdf>